

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-043037

(43)Date of publication of application : 13.02.2003

(51)Int.Cl. G01N 33/53  
C12M 1/00  
C12N 15/09  
G01N 5/02  
G01N 21/27  
G01N 21/64  
G01N 33/483  
G01N 33/566  
G01N 33/58  
G01N 37/00  
// G01N 21/35  
G01N 31/22

(21)Application number : 2001-228374

(71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL  
RES

(22)Date of filing : 27.07.2001

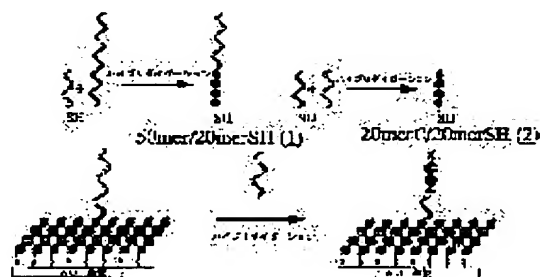
(72)Inventor : NAKAMURA FUMIO  
HARA MASAHIKO  
NAKAJIMA TAKESHI  
ITO EISUKE

## (54) SUBSTRATE FOR HYBRIDIZATION, MANUFACTURING METHOD AND USAGE METHOD OF THE SUBSTRATE

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a substrate for hybridization where surface coverage rate and activity are improved and DNA chains are immobilized on the substrate surface, to provide a manufacturing method of the substrate, and further to provide a complementary testing method using the substrate.

**SOLUTION:** In the substrate for hybridization, a DNA chain having a double chain section and a single chain section is immobilized on the surface of a substrate, and the double change section side of the DNA chain is immobilized to the substrate surface. In the manufacturing method of the substrate, a double chain section and a single chain section are provided on the metal surface of a metal substrate or a substrate having a metal covering, a DNA chain having a thiol group is brought into contact with the end of the double chain section, and the DNA chain is immobilized on the metal surface. A method for testing the complementarity of a target DNA with the single chain section of the DNA chain which has the target DNA, a double chain section and a single chain section by bringing the target DNA into contact with the surface where the DNA chain on the substrate is immobilized, is also provided.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2003-43037  
(P2003-43037A)

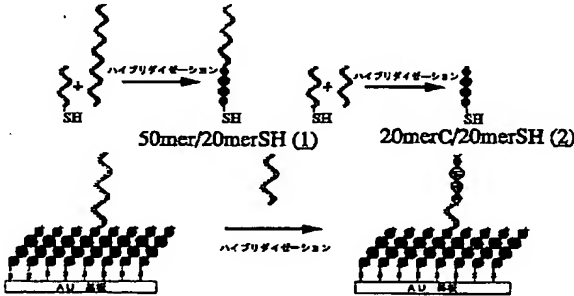
(43)公開日 平成15年2月13日(2003.2.13)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 2
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 3
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 5/02	A 2 G 0 4 5
G 0 1 N 5/02		21/27	C 2 G 0 5 9
21/27		21/64	F 4 B 0 2 4
審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001-228374(P2001-228374)	(71)出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22)出願日	平成13年7月27日(2001.7.27)	(72)発明者	中村 史夫 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
		(72)発明者	原 正彦 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
		(74)代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス (外3名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ハイブリダイゼーション用基板、この基板の製造方法及び使用方法

(57)【要約】  
【課題】表面被覆率及び活性度を高めた、基板表面にDNA鎖を固定化したハイブリダイゼーション用基板及びその製造方法を提供し、さらにはこの基板を用いた相補性試験方法を提供すること。  
【解決手段】基板表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖が固定化されており、かつ前記DNA鎖は、前記二重鎖部分側が前記基板表面に固定化されているハイブリダイゼーション用基板。金属基板または金属被覆を有する基板の金属表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記金属表面に固定化させる、基板の製造方法。上記基板のDNA鎖を固定化した表面にターゲットDNAを接触させ、ターゲットDNAと二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖の一重鎖部分との相補性を試験する方法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】基板表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖が固定化されており、かつ前記DNA鎖は、前記二重鎖部分側が前記基板表面に固定化されているハイブリダイゼーション用基板。

【請求項2】前記基板が金属基板または金属被覆を有する基板であり、かつ該基板の金属表面に前記DNA鎖が硫黄原子を介して固定化されている請求項1に記載の基板。

【請求項3】前記基板がガラス基板またはシリコン基板であり、かつ該基板の表面に前記DNA鎖が硫黄原子を介して固定化されている請求項1に記載の基板。

【請求項4】前記二重鎖部分の塩基数は10～80の範囲であり、前記一重鎖部分の塩基数は20～90の範囲である請求項1～3のいずれか1項に記載の基板。

【請求項5】前記二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖に加えて、二重鎖部分のみを有するDNA鎖が前記基板の表面にさらに固定化されている請求項1～4のいずれか1項に記載の基板。

【請求項6】前記基板が金属基板または金属被覆を有する基板であり、かつ該基板の金属表面に前記二重鎖部分のみを有するDNA鎖が硫黄原子を介して固定化されている請求項5に記載の基板。

【請求項7】前記基板がガラス基板またはシリコン基板であり、かつ該基板の表面に前記二重鎖部分のみを有するDNA鎖が硫黄原子を介して固定化されている請求項5に記載の基板。

【請求項8】前記二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖と前記二重鎖部分のみを有するDNA鎖との固定化数の割合は、99：1～1：99の範囲である請求項5～7のいずれか1項に記載の基板。

【請求項9】前記金属基板または金属被覆が金製である請求項2または6に記載の基板。

【請求項10】金属基板または金属被覆を有する基板の金属表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記金属表面に固定化させる、請求項2に記載の基板の製造方法。

【請求項11】金属基板または金属被覆を有する基板の金属表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖及び末端にチオール基を有する二重鎖部分のみからなるDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記金属表面に固定化させる、請求項6に記載の基板の製造方法。

【請求項12】ヘテロ2官能性架橋剤を表面処理したガラス基板またはシリコン基板の表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記表面に固定化させる、請求項3に記載の基板の製造方法。

【請求項13】ヘテロ2官能性架橋剤を表面処理したガラス基板またはシリコン基板の表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖及び末端にチオール基を有する二重鎖部分のみからなるDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記表面に固定化させる、請求項7に記載の基板の製造方法。

【請求項14】ヘテロ2官能性架橋剤が、スクシンイミジル4-[マレイミドフェニル]ブチレート(SMPB)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-(γ-マレイミドブチロキシ)スクシンイミドエステル(GMBS)、m-マレイミドプロピオニックアシド-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MPS)及びN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)からなる群から選ばれる少なくとも1種の架橋剤である請求項12または13に記載の製造方法。

【請求項15】前記DNA鎖の表面への接触を、2価金属イオンの存在下で行う請求項10～14のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項16】2価金属イオンがマグネシウムイオンである請求項15に記載の製造方法。

【請求項17】請求項1～9のいずれか1項に記載の基板の前記DNA鎖を固定化した表面にターゲットDNAを接触させ、前記ターゲットDNAと前記二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖の一重鎖部分との相補性を試験する方法。

【請求項18】DNA鎖を固定化した表面へのターゲットDNAの接触を、2価金属イオンの存在下で行う請求項17に記載の方法。

【請求項19】2価金属イオンがマグネシウムイオンである請求項18に記載の方法。

【請求項20】ターゲットDNAと前記DNA鎖の一重鎖部分とのハイブリダイゼーションの有無を表面プラズモン共鳴法または水晶振動子法により検出する請求項17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】ターゲットDNAが蛍光標識を有するDNAであり、前記DNA鎖の一重鎖部分とのハイブリダイゼーションの有無を蛍光により検出する請求項17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】塩基のミスマッチを含むターゲットDNAを検出するための請求項17～21のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ハイブリダイゼーション用基板、この基板の製造方法及びこの基板を使用する相補性試験方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決すべき課題】遺伝子診断や病原菌の特定、あるいは一塩基多型の検出等、ある種の核酸(標的核酸)を検出する目的で核酸プローブが用いられる。核酸プローブは標的核酸と混合され、核酸プローブと標的核酸とのハイブリダイズの有無を、例えば、核酸プローブが有する、蛍光標識等の標識を用いて検知する。上記核酸プローブとしては、DNA合成機により容易に合成できるという理由から、DNAプローブが主に使用されている。また、標的核酸とハイブリダイズした核酸

プローブを検知しやすいという観点から、蛍光標識を用いられることが多いが、蛍光標識以外に、RIなどが用いられる場合もある。そして、近年、多数の核酸プローブ核酸を基材に固定したDNAチップやDNAマイクロアレイが実用されるようになり、標的核酸の検出に使用されている。

【0003】DNAチップやDNAマイクロアレイの作製においては、基板にDNAを固定化する必要がある。DNAの固定化には、例えば、チオールを一本鎖DNAに接合させ、チオール化した一本鎖DNAを、例えば、金属基板に固定化する方法が取られていた。しかし、この方法で固定化したDNAは、基板上で倒れた構造となってしまう。そのため、表面被覆率、活性度がともに著しく低いという問題があった。これに対して、一本鎖DNAとチオールとの間にアルキル鎖を導入することによって、表面被覆率、活性度を高める試みが数多く報告されている(例えば、J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 9787-9792参照)。しかし、この手法では、一本鎖DNAへの修飾(長鎖アルキル鎖の導入)に多大な手間とコストが掛かる上、表面への混合物の導入も必要であることから実用化は困難であった。

【0004】そこで本発明の目的は、表面被覆率及び活性度を高めた、基板表面にDNA鎖を固定化したハイブリダイゼーション用基板及びその製造方法を提供し、さらにはこの基板を用いた相補性試験方法を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決する本発明は以下のとおりである。

【請求項1】基板表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖が固定化されており、かつ前記DNA鎖は、前記二重鎖部分側が前記基板表面に固定化されているハイブリダイゼーション用基板。

【請求項2】前記基板が金属基板または金属被覆を有する基板であり、かつ該基板の金属表面に前記DNA鎖が硫黄原子を介して固定化されている請求項1に記載の基板。

【請求項3】前記基板がガラス基板またはシリコン基板であり、かつ該基板の表面に前記DNA鎖が硫黄原子を介して固定化されている請求項1に記載の基板。

【請求項4】前記二重鎖部分の塩基数は10~80の範囲であり、前記一重鎖部分の塩基数は20~90の範囲である請求項1~3のいずれか1項に記載の基板。

【請求項5】前記二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖に加えて、二重鎖部分のみを有するDNA鎖が前記基板の表面にさらに固定化されている請求項1~4のいずれか1項に記載の基板。

【請求項6】前記基板が金属基板または金属被覆を有する基板であり、かつ該基板の金属表面に前記二重鎖部分のみを有するDNA鎖が硫黄原子を介して固定化されている請求項5に記載の基板。

【請求項7】前記基板がガラス基板またはシリコン基板であり、かつ該基板の表面に前記二重鎖部分のみを有するDNA鎖が硫黄原子を介して固定化されている請求項5に記載の基板。

【請求項8】前記二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖と前記二重鎖部分のみを有するDNA鎖との固定化数の割合は、99:1~1:99の範囲である請求項5~7のいずれか1項に記載の基板。

【請求項9】前記金属基板または金属被覆が金製である請求項2または6に記載の基板。

【請求項10】金属基板または金属被覆を有する基板の金属表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記金属表面に固定化させる、請求項2に記載の基板の製造方法。

【請求項11】金属基板または金属被覆を有する基板の金属表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖及び末端にチオール基を有する二重鎖部分のみからなるDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記金属表面に固定化させる、請求項6に記載の基板の製造方法。

【請求項12】ヘテロ2官能性架橋剤を表面処理したガラス基板またはシリコン基板の表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記表面に固定化させる、請求項3に記載の基板の製造方法。

【請求項13】ヘテロ2官能性架橋剤を表面処理したガラス基板またはシリコン基板の表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖及び末端にチオール基を有する二重鎖部分のみからなるDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記表面に固定化させる、請求項7に記載の基板の製造方法。

【請求項14】ヘテロ2官能性架橋剤が、スクシンイミジル4-[マレイミドフェニル]ブチレート(SMPB)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ

レート (SMCC)、N-( $\gamma$ -マレイミドブチロキシ) スクシンイミドエステル (GMBS)、m-マレイミドプロピオンニックアシド-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MPS) 及びN-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル) アミノベンゾエート (S I A B) からなる群から選ばれる少なくとも1種の架橋剤である請求項12または13に記載の製造方法。

【請求項15】前記DNA鎖の表面への接触を、2価金属イオンの存在下で行う請求項10～14のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項16】2価金属イオンがマグネシウムイオンである請求項15に記載の製造方法。

【請求項17】請求項1～9のいずれか1項に記載の基板の前記DNA鎖を固定化した表面にターゲットDNAを接触させ、前記ターゲットDNAと前記二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖の一重鎖部分との相補性を試験する方法。

【請求項18】DNA鎖を固定化した表面へのターゲットDNAの接触を、2価金属イオンの存在下で行う請求項17に記載の方法。

【請求項19】2価金属イオンがマグネシウムイオンである請求項18に記載の方法。

【請求項20】ターゲットDNAと前記DNA鎖の一重鎖部分とのハイブリダイゼーションの有無を表面プラズモン共鳴法または水晶振動子法により検出する請求項17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】ターゲットDNAが蛍光標識を有するDNAであり、前記DNA鎖の一重鎖部分とのハイブリダイゼーションの有無を蛍光により検出する請求項17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】塩基のミスマッチを含むターゲットDNAを検出するための請求項17～21のいずれか1項に記載の方法。

【0006】

【発明の実施の形態】[基板]本発明のハイブリダイゼーション用基板は、基板表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖が固定化されており、かつ前記DNA鎖は、前記二重鎖部分側が前記基板表面に固定化されていることを特徴とする。

【0007】従来のDNAを固定化した基板は、DNAが一本鎖であった。それに対して本発明では、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖を用いる。即ち、本発明で使用するDNA鎖は、一方の鎖が他方の鎖よりも長く、ある部分は二重鎖であり、残りの部分が一重鎖である。そして、本発明で使用するDNA鎖は、二重鎖部分から始まり、途中から最後まで一重鎖部分である。二重鎖部分の塩基数及び一重鎖部分の塩基数には特に制限や限定はないが、二重鎖部分の塩基数は、例えば、二重鎖部分の安定性という観点から10～80の範囲とすることができ、一重鎖部分の塩基数は、一重鎖部分の動きやす

さという観点から20～90の範囲であることができる。上記のようなDNA鎖は、長さが異なる2本の一本鎖であって、短鎖の一本鎖DNAは、塩基配列が、長鎖の一本鎖DNAのいずれかの端からの塩基配列と、相補的である、2本の一本鎖をハイブリダイズすることで作製することができる。

【0008】本発明の基板では、上記二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖が、前記二重鎖部分側で基板表面に固定化されている。このような構造を有することで、基板表面寄りには、二重鎖部分があるが、基板表面から離れた場所では、DNA鎖は一重鎖部分となり、一重鎖部分の周囲にはある程度の空間が生じ、一重鎖部分をハイブリダイズ用の配列として利用し易くなり、かつ基板表面に近い場所では二重鎖部分を密に存在させて、DNA鎖の横倒れを防止できるという利点がある。

【0009】DNA鎖の基板表面への固定化は、例えば、基板が金属基板または金属被覆を有する基板である場合、基板の金属表面にDNA鎖が硫黄原子を介して固定化させることができる。金属基板としては、例えば、金、銀、クロム、ガリウム、ニッケル、オネジウム等の金属製の基板を挙げることができる。また、金属被覆を有する基板としては、ガラス、マイカ(雲母)等の基板の表面に、金、銀、クロム、ガリウム、ニッケル、オネジウム等の金属被覆を設けた基板を挙げることができる。基板の金属表面へのDNA鎖の硫黄原子を介しての固定化については基板の製造方法において詳述する。

【0010】また、DNA鎖の基板表面への固定化は、例えば、基板がガラス基板またはシリコン基板である場合、基板の表面に前記DNA鎖が硫黄原子を介して固定化させることができる。ガラス基板としては、一般的なスライドガラス等のガラス基板を挙げることができる。また、シリコン基板は、シリコンウエハ等であることができる。基板の表面へのDNA鎖の硫黄原子を介しての固定化については基板の製造方法において詳述する。

【0011】本発明の基板は、前記二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖に加えて、二重鎖部分のみを有するDNA鎖が前記基板の表面にさらに固定化されているものであることもできる。基板の表面に二重鎖部分のみを有するDNA鎖をさらに固定化することで、基板表面から離れた場所での一重鎖部分の周囲にある空間がより広がり、一重鎖部分をハイブリダイズ用の配列としてより利用し易くなるとともに、基板表面に近い場所では二重鎖部分をさらに密に存在させて、DNA鎖の横倒れを防止できるという利点がある。

【0012】上記基板は、例えば、金属基板または金属被覆を有する基板であることができ、その場合、基板の金属表面には、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖に加えて、二重鎖部分のみを有するDNA鎖も硫黄原子を介して固定化される。また、上記基板は、ガラス基板またはシリコン基板であることもでき、その場合、

10

20

30

40

50

かつ基板の表面には、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖に加えて、二重鎖部分のみを有するDNA鎖が硫黄原子を介して固定化される。

【0013】上記のように二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖に加えて、二重鎖部分のみを有するDNA鎖も基板表面に固定化する場合、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖と二重鎖部分のみを有するDNA鎖との固定化数の割合は、ハイブリダイズ用の配列である一重鎖部分の密度(密集度)を考慮して適宜決定できるが、例えば、99:1~1:99の範囲、好ましくは99:1~25:75の範囲であることが適当である。

【0014】【基板の製造方法】本発明の基板は、例えば、基板が、金属基板または金属被覆を有する基板の場合、これら基板の金属表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記金属表面に固定化させることで製造することができる。二重鎖部分及び一重鎖部分を有する二本鎖DNAは、前述のように、長さが異なる2本の一本鎖であって、短鎖の一本鎖DNAは、塩基配列が、長鎖の一本鎖DNAのいずれかの端からの塩基配列と、相補的である、2本の一本鎖をハイブリダイズすることで作製することができる。そして、例えば、短鎖の一本鎖DNAの5'端にチオール基を導入し、この短鎖の一本鎖DNAの配列と3'端側が相補的配列である長鎖の一本鎖DNAとをハイブリダイズさせれば、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖が得られる。一本鎖DNAの5'端へのチオール基の導入は、例えば、公知のC6合成方法を用いて行うことができる。

(例えば、化学と生物実験ライン22、丹羽峰雄著、"DNAの化学合成"38~43頁、廣川書店参照)

また、短鎖の一本鎖DNAの配列と3'端側が相補的配列である長鎖の一本鎖DNAとのハイブリダイズも通常の方法と条件で適宜行うことができる。

【0015】基板の金属表面へのDNA鎖の固定化は、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖を金属表面と接触させることができる。チオール基を有するDNA鎖の金属表面への固定化は例えば、J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 9787-9792に記載され、公知の方法である。

【0016】さらに、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖及び末端にチオール基を有する二重鎖部分のみからなるDNA鎖の所定割合の混合物を金属基板または金属被覆を有する基板の金属表面に、上記と同様に接触させることで、所定の割合で二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖及び二重鎖部分のみからなるDNA鎖を金属表面に固定化させることもできる。

【0017】本発明の基板は、基板がガラス基板またはシリコン基板の場合、例えば、これらの基板の表面をへ

テロ2官能性架橋剤で表面処理し、表面処理した表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖を接触させて、前記DNA鎖を前記表面にさせることで製造できる。二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖は上記の方法で製造することができる。

【0018】上記のように、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖の二重鎖部分の末端にチオール基を導入するが、チオール基を導入する鎖は、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖の短鎖であっても、長鎖であっても良い。但し、二重鎖部分のみを構成する短鎖にチオール基を導入することが好ましい。何故なら、ハイブリダイゼーションに関与することになる一重鎖部分を有する長鎖を、短鎖とハイブリダイゼーションさせる以外の処理することなく、使用できるという利点があるからである。

【0019】この固定化方法は、例えば、Nucleic Acid Research, 1996, Vol. 24, No. 15, 3031-3039に記載されている。上記ヘテロ2官能性架橋剤は、スクシンイミジル4-[マレイミドフェニル]ブチレート(SMPB)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-(γ-マレイミドブチロキシ)スクシンイミドエステル(GMBS)、m-マレイミドプロピオニックアシド-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MPS)及びN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)からなる群から選ばれる少なくとも1種の架橋剤であることができる。

【0020】さらに、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖及び末端にチオール基を有する二重鎖部分のみからなるDNA鎖を所定割合で含む混合物を、ヘテロ2官能性架橋剤を表面処理したガラス基板またはシリコン基板の表面に接触させることで、前記2種のDNA鎖を所定割合で表面に固定化させることができる。

【0021】上記基板の金属表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖、または二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖及び末端にチオール基を有する二重鎖部分のみからなるDNA鎖を所定割合で含む混合物を接触させて、前記DNA鎖を前記金属表面に固定化させる方法においては、前記DNA鎖の金属表面への接触を、2価金属イオンの存在下で行うことが好ましい。2価金属イオンの存在下で行うことで、二重鎖部分の安定性が増加し、さらに二重鎖部分が凝集し、基板上で安定に存在するという利点がある。また、2価金属イオンとしては、例え



ば、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、コバルトイオン、バリウムイオン、ストロンチウムイオン、カドミウムイオン、亜鉛イオン、鉄イオン等を挙げることができる。これら2価金属イオンの濃度は、例えば、1~1000mMの範囲とすることが適当である。

【0022】同様に、上記ヘテロ2官能性架橋剤で表面処理した基板表面に、二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖、または二重鎖部分及び一重鎖部分を有し、かつ前記二重鎖部分の末端にチオール基を有するDNA鎖及び末端にチオール基を有する二重鎖部分のみからなるDNA鎖を所定割合で含む混合物を接触させて、前記DNA鎖を前記表面に固定化させる方法においても、前記DNA鎖の表面への接触を、上記と同様の2価金属イオンの存在下で行うことが、上記と同様の理由で好ましい。

【0023】〔相補性を試験する方法〕本発明の相補性試験方法は、上記本発明の基板のDNA鎖を固定化した表面にターゲットDNAを接触させ、このターゲットDNAと二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖の一重鎖部分との相補性を試験することを含む。より具体的には、二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖の一重鎖部分とハイブリダイズしたターゲットDNAの存在を適当な手段で検出して、相補性を試験する。

【0024】ターゲットDNAとDNA鎖の一重鎖部分とのハイブリダイゼーションの有無の検出は、公知の方法を適宜使用できるが、例えば、表面プラズモン共鳴法または水晶振動子法により検出する方法を挙げることができる。表面プラズモン共鳴法は、基板表面にレーザ光を照射し、基板表面で生じる表面プラズモン共鳴を測定することで基板表面に存在する膜等の厚みを測定する方法であり、ターゲットDNAとハイブリダイゼーションしたDNA鎖の存在の有無を膜厚の違いとして認識し、ハイブリダイゼーションの有無を検出する。表面プラズモン共鳴法では、ターゲットDNAや基板に固定するDNA鎖に標識を付す必要がなく、簡便にハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。

【0025】水晶振動子法は、水晶振動子の電極への物質の付着による振動数の減少から付着物の質量を求める方法である(例えば、Chem. Rev., 1992, 92, 1355-1379参照)。

【0026】ターゲットDNAとDNA鎖の一重鎖部分とのハイブリダイゼーションの有無の検出は、例えば、ターゲットDNAが蛍光標識を有するDNAであり、前記DNA鎖の一重鎖部分とのハイブリダイゼーションの有無を蛍光により検出することによっても行うことができる。蛍光標識を有するDNA及びハイブリダイゼーションの有無を蛍光により検出する方法も公知であり、本発明では、それら公知の技術をそのまま使用することができる。

【0027】本発明の相補性試験方法では、塩基のミス

マッチを含むターゲットDNAを検出することもできる。即ち、本発明の相補性試験方法では、完全相補的なターゲットDNAは、ハイブリダイゼーションをするが、一塩基ミスマッチを含むターゲットDNAは、ハイブリダイゼーションをせず、その結果、一塩基ミスマッチを含むターゲットDNAを検出することもできる。

【0028】本発明の相補性試験方法では、DNA鎖を固定化した表面へのターゲットDNAの接触を、2価金属イオンの存在下で行うことがハイブリダイゼーション後の二重鎖部分の安定性という観点から好ましい。2価金属イオンとしては、例えば、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、コバルトイオン、バリウムイオン、ストロンチウムイオン、カドミウムイオン、亜鉛イオン、鉄イオン等を挙げることができる。これら2価金属イオンの濃度は、例えば、1~1000mMの範囲とすることが適当である。

【0029】尚、本発明では基板にDNA鎖を固定する態様について説明した。しかし、例えば、二重鎖部分及び一重鎖部分のいずれかの一本鎖がRNAであってもよい。また、二重鎖部のみからなる鎖のいずれかの一本鎖がRNAであってもよい。

【0030】

【実施例】以下本発明を実施例によりさらに説明する。  
実施例1

図1に示すスキームに従って、チオール化したDNAオリゴマー(二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖(50マーと20マーとの2本鎖DNA(1))及び二重鎖部分のみからなるDNA鎖(20マーと20マーとの2本鎖DNA(2)))を調製し、基板に固定化し、さらにハイブリダイゼーションに使用した。

【0031】〔チオール化したDNAオリゴマーの合成〕5'末端チオール化したHS-5'-ATGCATGCATTAGCATGCTA-3'(20merSH)を公知のC6合成方法を用いて合成した。(例えば、化学と生物実験ライン22、丹羽峰雄著、"DNAの化学合成"38~43頁、廣川書店参照)

【0032】〔チオール化した二重鎖DNAオリゴマーの金表面への固定化〕上記で合成した5'末端チオール化したHS-5'-ATGCATGCATTAGCATGCTA-3'(20merSH)と5'-TAGCATGCTAATGCATGCTTTTTTTTTTTTGGAGAACTGATCGACACAG-3'(50mer)を緩衝溶液中で95℃まで過熱し、徐々に冷却することによって、一部が二重らせん化した50mer/20merSH複合体(1)を形成させ、プローブDNAとした。同様の手順により、5'-TAGCATGCTAATGCATGCT-3'(20mer)と20merSHの複合体20merC/20merSH(2)を形成させ、混合希釈化合物として用いた。上記50mer/20merSH複合体(1)及び20merC/20merSH複合体(2)を用い、以下の条件でチオール化した二重鎖DNAオリゴマーの金基板表面への固定化を行った。

バッファの種類: MgCl<sub>2</sub>, (H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> を20mMの濃度に調整し、この溶液を120℃で20分間滅菌した後、溶媒と

して使用した。

チオール化した二重鎖DNAオリゴマー濃度：1.30 D (約3.07マイクロモル)。

温度：20℃

後処理：溶媒でリンスして過剰のDNAを洗い流した。

【0033】[ハイブリダイゼーション実験]上記で得られた二重鎖DNAオリゴマーを固定化した基板にターゲットDNAをハイブリダイゼーションさせた。プローブDNAのプローブ部位へ相補的に相互作用が期待される5'-CTGTGTCGATCAGTTCTCCA-3' (20merM)をターゲットDNAとして用いた。さらに塩基の互変異性構造(塩基のミスマッチング)の検出実験のために、20merMと1つだけ塩基配列が異なる5'-CTGTGTCATCAGTTCTCCA-3' (20merS)をコントロールDNAとして用いた。ハイブリダイゼーションのためにDNAを溶解させる溶媒としては20mMのMgCl<sub>2</sub>水溶液を用いた。ハイブリダイゼーションの温度は20℃とし、2時間行った。

【0034】[DNA単分子膜の評価の具体的方法]金属固体基板上へ吸着およびターゲットDNAと基板に固定化したプローブDNAとの相互作用(ハイブリダイゼーション)は表面プラズモン共鳴によりその場観察を行なった。また、DNA単分子膜の評価は原子間力顕微鏡(AFM)、光電子分光法(XPS)、反射赤外分光法(IR-RAS)により行なった。

【0035】[DNA固定化の確認]上記50mer/20merSH複合体(1)及び20merC/20merSH複合体(2)の比率を0:100、50:50、100:0と変化させたときの金基板表面への固定化の状況を、表面プラズモン共鳴によりその場観察し、結果を図2に示す。MgCl<sub>2</sub>含有バッファーを使用した場合、どの比率でも金基板表面に複

\* 合体が固定化されていることが確認された。

【0036】[ハイブリダイゼーションの確認]上記50mer/20merSH複合体(1)及び20merC/20merSH複合体(2)の比率を0:100、25:75、50:50、75:25、100:0と変化させて上記複合体を金基板表面に固定化した基板を用い、この基板にターゲットDNA 5'-CTGTGTCGATCAGTTCTCCA-3' (20merM)をハイブリダイズさせた状況を表面プラズモン共鳴によりその場観察した。結果を図3に示す。50mer/20merSH複合体(1)の比率が高くなる程、ハイブリダイゼーションの比率も高まり、75:25及び100:0では、ほぼ同様の結果が得られた。

【0037】[一塩基ミスマッチの確認]上記50mer/20merSH複合体(1)及び20merC/20merSH複合体(2)の比率を100:0として上記複合体を金基板表面に固定化した基板を用い、この基板にターゲットDNA 5'-CTGTGTCGATCAGTTCTCCA-3' (20merM)及び1つだけ塩基配列が異なるコントロールDNA 5'-CTGTGTCATCAGTTCTCCA-3' (20merS)をハイブリダイズさせた状況を表面プラズモン共鳴によりその場観察した。結果を図4に示す。図4に示す結果から、本発明の方法によれば、一塩基ミスマッチを識別できることが分かる。

【0038】

【発明の効果】本発明によれば、表面被覆率及び活性度を高めた、基板表面にDNA鎖を固定化したハイブリダイゼーション用基板及びその製造方法を提供でき、さらにはこの基板を用いた相補性試験方法を提供することができる。

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```
<110> RIKEN
<120> Substrate for hybridization, method for preparation of the substrate and the use thereof
<130> A15120H
<160> 5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 1
atgcatgcat tagcatgcta 20
<210> 2
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 2
tagcatgcta atgcatgcat tttttttttt tggagaactg atcgacacag 50
<210> 3
<211> 20
```



13

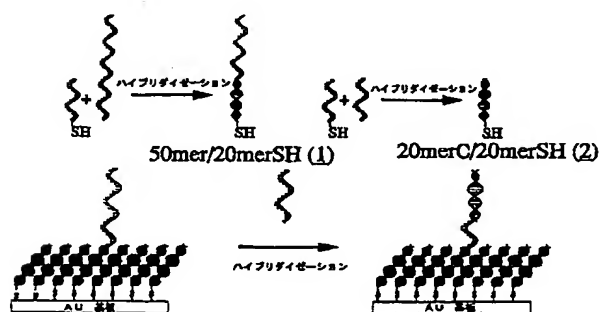
<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 3  
 tagcatgcta atgcatgcat 20  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 4  
 ctgtgtcgaat cagttctcca 20  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 5  
 ctgtgtcaat cagttctcca 20

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例における、チオール化したDNAオリゴマー（二重鎖部分及び一重鎖部分を有するDNA鎖（50mer/20merSH複合体（1））及び二重鎖部分のみからなるDNA鎖（20merC/20merSH複合体（2））の調製、基板への固定化、及びハイブリダイゼーションのスキームを示す。

【図2】50mer/20merSH複合体（1）及び20merC/20merSH複合体（2）の比率を0:100、50:50、100:0と変化させたときの金基板表面への固定化の状況\*

【図1】



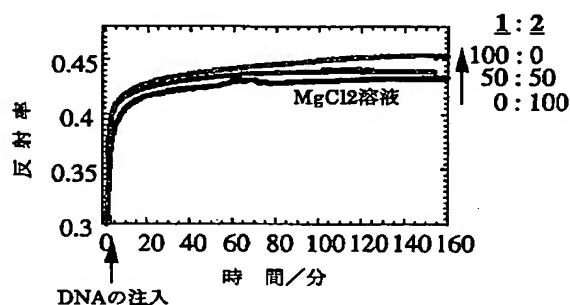
14

\* を、表面プラズモン共鳴によりその場観察した結果。

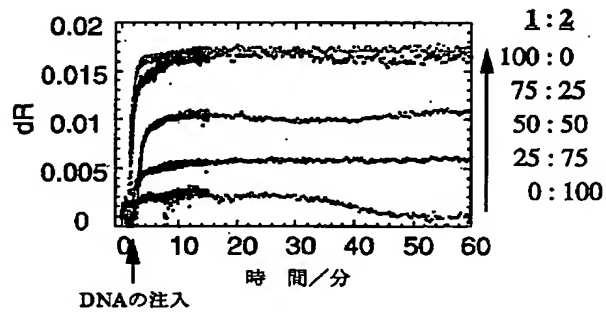
【図3】基板にターゲットDNA 5'-CTGTGTCGATCAGTTCTCCA-3'（20merM）をハイブリダイズさせた状況を表面プラズモン共鳴によりその場観察した結果。

【図4】ターゲットDNA 5'-CTGTGTCGATCAGTTCTCCA-3'（20merM）及び1つだけ塩基配列が異なるコントロールDNA 5'-CTGTGTCAATCAGTTCTCCA-3'（20merS）をハイブリダイズさせた状況を表面プラズモン共鳴によりその場観察した結果。

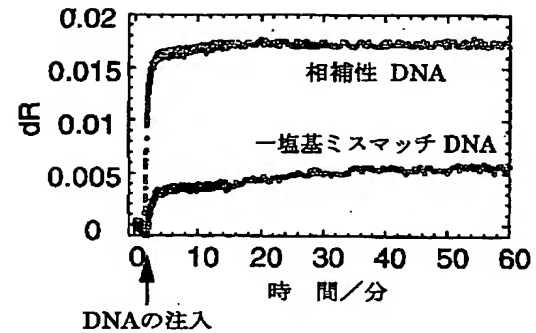
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		識別記号	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N	21/64		G 0 1 N 33/483	A 4 B 0 2 9
	33/483			C
	33/566		33/566	
	33/58		33/58	A
	37/00	1 0 2	37/00	1 0 2
// G 0 1 N	21/35		21/35	Z
	31/22	1 2 1	31/22	1 2 1 P
			C 1 2 N 15/00	Z N A F

(72)発明者 中嶋 健  
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
内  
(72)発明者 伊藤 英輔  
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
内

F ターム(参考) 2G042 AA01 BD19 CA10 CB03 DA08  
FA11 FB02 FB05 HA02  
2G043 AA03 BA16 DA02 EA01 LA01  
2G045 AA35 BB22 DA13 FA03 FA11  
FB02 FB12 GC15  
2G059 AA05 BB12 CC16 EE02 HH01  
JJ01 KK01  
4B024 AA11 BA80 CA04 CA05 CA09  
HA11 HA12 HA13  
4B029 AA07 AA21 BB20 CC03 FA02  
FA10 FA15